

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 498–503

Gaschromatographische Bestimmung von Pantothensäure in Urin

Von Erika Schulze zur Wiesch, Chr. Hesse und D. Hötzel

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft (Dir.: Prof. Dr. D. Hötzel) der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

(Eingegangen am 30. Mai/5. August 1974)

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde eine gaschromatographische Methode der Pantothensäurebestimmung mit dem Ziel ihrer Anwendung in biologischem Material erarbeitet.

Folgende Voraussetzungen sind bei der Durchführung dieser Methode erfüllt:

Ein verdampfbares Spaltprodukt der Pantothensäure kann mit reproduzierbarer Ausbeute hergestellt werden.

Dieses Spaltprodukt kann aus der wäßrigen Phase reproduzierbar durch Lösungsmittel extrahiert werden.

Die Substanz gibt bei der Messung ein der eingesetzten Menge proportionales Signal.

Mengen von 0,5–100,0 µg Pantothensäure je Analyse können erfaßt werden.

Die Bestimmung von Pantothensäure im Urin wird beschrieben: Durch saure Hydrolyse der Pantothensäure entsteht das Pantolacton, das sich durch Dichlormethan extrahieren läßt. Die gaschromatographische Messung erfolgt nach der Zugabe eines inneren Standards. Urinproben werden durch Ionenaustauscherbehandlung aufgearbeitet.

Angaben zur Linearität der Messung, zur Richtigkeit, Spezifität und Reproduzierbarkeit der Analyse werden beschrieben. Die Bestimmung der Pantothensäure im Urin ist mit einer Fehlergrenze von $\pm 6\%$ möglich.

The gas chromatographic determination of pantothenic acid in urine

A method for the determination of pantothenic acid by gaschromatography was developed for the analysis of biological materials.

The following conditions are met by this method:

A volatile breakdown product of pantothenic acid can be produced in reproducible yield.

This fragment can be extracted from aqueous solution by organic solvents.

The signal given by this substance is proportional to the amount of substance.

Pantothenic acid can thus be determined in quantities of 0.5–100.0 µg per analysis.

The determination of pantothenic acid in urine is described. Pantolactone is formed from pantothenic acid by acid hydrolysis and extracted from the aqueous phase by dichloromethane. It is measured gaschromatographically by the method of internal standardisation. Samples of urine are analysed after ion exchange chromatography.

Results are presented which demonstrate that the analysis is specific and can be reproduced. Pantothenic acid in urine can be determined with a standard deviation of $\pm 6\%$.

In der Literatur wird die Pantothensäure als ein vom Standpunkt der Bedarfsdeckung aus zu vernachlässigender Nahrungsinhaltsstoff angesehen (1, 2, 3). Die Zufuhr der wünschenswerten Menge dieses Vitamins erscheint den genannten Autoren durch eine Normalkost sichergestellt. Berechnungen in unserem Arbeitskreis (4) zeigten, daß dieser Auffassung nicht notwendigerweise gefolgt werden kann.

In unserem Arbeitskreis wurden systematische Tierversuche vorgenommen mit dem Ziel, Parameter für den Versorgungszustand eines Organismus mit Pantothensäure zu finden. Eine Voraussetzung für diese Experimente war es, die Pantothensäure in biologischem Material serienmäßig bestimmen zu können.

Bisher wurden zur Bestimmung von Pantothensäure biologische, mikrobiologische und physikalisch-chemische Methoden angewandt. Die biologische Methode erlaubt

die Bestimmung freier und gebundener Pantothensäure (5).

Die Testorganismen, die bei mikrobiologischen Bestimmungsmethoden Anwendung finden, sprechen nur auf die freie Form der Pantothensäure an; eine vorherige Hydrolyse gebundener Formen ist erforderlich, wobei als Voraussetzung gilt, daß die Pantothensäure selbst nicht abgebaut wird. Die Erfassungsgrenze liegt im ng-Bereich (10^{-7} – 10^{-8} g). Die Fehlerbreite in der Wiederingang von Pantothensäure, die biologischem Material zugesetzt wurde, liegt nach Angaben von Skeggs & Wright (6) bei $\pm 4\%$. Die mikrobiologische Bestimmung ist derzeit die Grundlage aller Angaben über den Pantothensäuregehalt von Lebensmitteln und Körperflüssigkeiten (8–11).

Als physikalisch-chemische Methoden der Bestimmung von Pantothensäure kommen kolorimetrische (12–17),

fluorimetrische (18, 19) und gaschromatographische Messungen in Betracht. Während die beiden ersten Methoden zur Überprüfung des Pantothersäuregehaltes in Multivitaminpräparaten bereits eingesetzt werden konnten, sind Anwendungsbeispiele für die gaschromatographische Bestimmung nicht bekannt. Voraussetzung für die kolorimetrischen und fluorimetrischen Methoden ist die Spaltung des Pantothersäuremoleküls durch saure bzw. alkalische Hydrolyse. Die dabei entstehenden Spaltprodukte β -Alanin und Pantothensäure bei Alkali- und β -Alanin und Pantolacton bei Säurebehandlung werden so umgesetzt, daß der entstehende Farbkomplex eine quantitative Aussage über den Pantothersäuregehalt der Probe erlaubt. Hierfür sind Probenmengen von 0,2–3,0 mg erforderlich.

Tarli, Benocci & Neri (20) gehen in ihrer gaschromatographischen Bestimmungsmethode von der Hydrolyse des Pantothersäuremoleküls aus. Das entstandene β -Alanin wird zum N-Trifluoracetylmethylester umgesetzt, der sich gaschromatographisch mit innerem Standard quantitativ (Wiederfindung 102 %) bestimmen läßt. Voraussetzung dieser Methode ist ein wasserfreies Medium. Konzentrationen von 2,0–8,0 g/l Pantothersäure können mit dieser Methode erfaßt werden.

Prosser & Sheppard (21) erreichten durch Veresterung der Pantothersäure mit anschließender Acetylierung die Umsetzung dieses Vitamins zu einem verdampfbaren Derivat, das so gaschromatographisch erfaßt werden kann. Die quantitative Auswertung geschieht direkt, d. h. die Peakfläche gilt als Maßstab für die Pantothersäuremenge in der Probe. Mengen von 0,5–15,0 μ g konnten so bestimmt werden.

Methodik

Eine für die oben beschriebenen Experimente geeignete gaschromatographische Bestimmungsmethode für Pantothersäure muß folgende Voraussetzungen erfüllen:

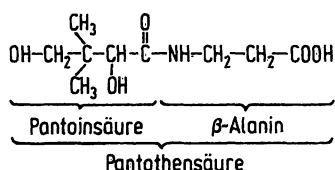
Ein verdampfbare Derivat der Pantothersäure muß sich mit reproduzierbarer Ausbeute herstellen und aus der wässrigen Phase extrahieren lassen.

Diese Substanz muß die Bedingung erfüllen, daß bei der Messung ein der eingesetzten Menge proportionales Signal gegeben wird.

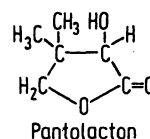
Die Empfindlichkeit der Methode sollte die Bestimmung von 0,5–1,0 μ g Pantothersäure erlauben.

Herstellung eines verdampfbaren Spaltproduktes der Pantothersäure

Ältere Arbeiten über die Strukturklärung der Pantothersäure (22, 23) zeigten, daß das Pantothersäuremolekül aus zwei Bausteinen besteht, der α , γ -Dihydroxy- β , β -dimethylbuttersäure (Pantothensäure) und dem β -Alanin



Nach alkalischer Hydrolyse lassen sich die beiden Spaltprodukte in der Aufschlußlösung nachweisen. Im sauren Medium bildet die Pantothensäure ein Lacton, das Pantolacton,



das sich durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln isolieren und durch Umkristallisieren aus Äther-Petroläther rein darstellen läßt. Der Schmelzpunkt des Pantolactons liegt bei 92–93°C. Das Lacton sublimiert im hohen Vakuum (25°C bei 10^{-4} mm) (22). Vorversuche ergaben, daß das Lacton ohne weitere Umsetzungen einen Peak im Gaschromatogramm (Retentionszeit bei den unten angegebenen Bedingungen 16 min) zeigte.

Strukturbeweis für das Pantolacton

Da es sich beim Pantolacton um eine Schlüsselverbindung der Pantothersäurebestimmung handelt, wurde es aus Ca-Pantothenat kristallin dargestellt und seine Struktur mit spektroskopischen Methoden überprüft.

Die Summenformel läßt sich aus dem M^+ -Peak des hochauflösten Massenspektrums (Varian MAT SM 1-B) ableiten ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$, $m/e = 130,065$, $130,077$ ber., $\Delta m = 12$ mME).

Daß ein γ -Lacton vorliegt, zeigt das Infrarotspektrum (1780 cm^{-1} C=O-Valenzschwingung). Das H-Kernresonanzspektrum (Varian A 56/60, Messung in Chloroform-d, innerer Standard Tetramethylsilan) zeigt zwei Singulett bei $\delta=1,10$ und $\delta=1,24$ ppm, die je drei Protonen entsprechen. Ein weiteres Singulett bei $\delta=4,05$ ppm läßt sich den beiden Methylprotonen neben dem Estersauerstoff zuordnen, die erwartungsgemäß nicht mit anderen Protonen koppeln (eine long-range Kopplung ist an einem solchen System nicht zu erwarten). Zwei breite Dubletts, bei $\delta=3,92$ und $\delta=4,23$ (je ein Proton), die beide eine Kopplungskonstante von etwa 4 Hz besitzen, lassen erwarten, daß das alkoholische Proton mit dem tertiären Proton koppelt. In der Tat verschwindet nach dem Schütteln mit D_2O das Dublett bei $\delta=3,92$ ppm. Aus dem Signal bei $\delta=4,23$ ppm wird ein scharfes Singulett. Unerwartet war zunächst die Aufspaltung der Methylsignale bei $\delta=1,10$ und $\delta=1,24$ ppm. Am Modell zeigt sich aber, daß die geminalen Methylgruppen in verschiedenem Abstand zum Alkoholsauerstoff am C-2 stehen. Wenn der Ring seine Konformation nicht wesentlich ändert, kann sich die verschiedene Umgebung der Methylgruppen auf deren chemische Verschiebung auswirken, wie hier beobachtet wurde.

Das normal aufgelöste Massenspektrum (Varian MAT SM 1-B) zeigt einen schwachen M^+ -Peak. Das nächste Fragment entsteht durch den Verlust von CO_2 , wie durch die Hochauflösung bestätigt wurde ($m/e = 86,0726$, ber. $86,0784$, $\Delta m = 6$ mME, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$). Dieses Fragment zerfällt weiter zu $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}$ ($m/e = 71,0485$, ber. $71,054$, $\Delta m = 30$ mME), durch den Verlust einer Methylgruppe und eines Protons. Der Basispeak bei $m/e = 43$ schließlich ist ein reiner Kohlenwasserstoffpeak (C_3H_7^+), der aus dem tertiären C-Atom mit seinen beiden Methylgruppen und einem Proton bestehen könnte.

Um Umwandlungen während der Gaschromatographie auszuschließen, wurde das Pantolacton auch in einer Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kombination (LKB 9000, $100 \text{ m} \times 0,5 \text{ mm}$ S. C.O.T., mit DEGA beschichtet) untersucht. Die so erhaltenen Massenspektren entsprechen ganz den auf andere Weise gemessenen.

Man kann also mit einiger Sicherheit annehmen, daß das Pantolacton in der Gaschromatographie unzersetzt meßbar ist.

Meßbedingungen

Für die Messung steht der Siemens Gaschromatograph L 400 mit Flammenionisationsdetektor zur Verfügung. Die Analysen werden bei einer Säulentemperatur von 140°C in Glassäulen (Länge 3 m, Innendurchmesser 3 mm) durchgeführt. Als Trennflüssigkeit hat sich LAC-2 R 446 bewährt (4 % auf Gaschrom

Q 120–150 mesh, Serva Heidelberg). Die Detektortemperatur beträgt 250°C. Ein Durchfluß von 35 ml/min H_2 hat sich bei der Messung der Grundionisation bei verschiedenen Durchflußraten als optimal erwiesen. Der Mengenfluß der Preßluft liegt bei 500 ml/min. Das Optimum der *van Deemter*-Funktion wird bei einem Trägergasdurchfluß (Stickstoff, nachgereinigt) von 13 ml/min erreicht.

Unter diesen Bedingungen zeigt das Lacton einen symmetrischen Peak mit einer Retentionszeit von 20 min.

Quantitative Auswertung

Durch die Anwendung eines inneren Standards (Myristinsäuremethylester, Merck, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie) ist die Auswertung von der dosierten Menge nicht abhängig. Mögliche Fehlerquellen sind allenfalls auf die Wägungen von Probe und Standard und die Auswertung beschränkt, da die quantitative Erfassung auf der Verhältnisbestimmung zweier Meßwerte beruht. Die Flächenwerte der Peaks wurden nach der Näherungsmethode "Höhe mal Breite in halber Höhe" ermittelt (24).

Arbeitsvorschrift

Eine Probenmenge, die 0,5 und 100 µg Pantothenensäure bzw. eine entsprechende Menge an Ca-Pantothenat (DAB7) enthält, wird mit dest. Wasser auf 5 ml aufgefüllt und mit Salzsäure (rauchend, mind. 37 %, p.a.) auf einen pH unter 1 gebracht. Hydrolyse der Pantothenensäure und Lactonisierung der entstehenden Pantoinensäure laufen während zweistündiger Erhitzung (nach 15 min Aufheizzeit) ab. Eine Temperatur von 85°C sollte nicht überschritten werden, da bei einer Erhitzung in der Nähe des Schmelzpunktes des Lactons (93°C) Zersetzungerscheinungen zu erwarten sind.

Zur Extraktion des Lactons wird Dichlormethan (DAB 7) verwendet. Um das Auftreten von Störpeaks im Gaschromatogramm zu vermeiden, wird das Dichlormethan zuvor durch Waschen mit 3 × 100 ml dest. Wasser/l Dichlormethan gereinigt. Danach erfolgen Trocknen mit Kaliumcarbonat (DAB 7) und Destillation über eine Füllkörperkolonne bei hohem Rücklaufverhältnis.

Nach Abkühlung werden die Proben 3 mal mit je 10 ml Dichlormethan 20 min extrahiert. Vor dem Eindampfen am Rotationsverdampfer erfolgt die Zugabe des Standards. Durch zweimaliges Überspülen überführt man Lacton und Standard in Reaktionsröhrchen (Serva, Reaktionsröhrchen für die Gaschromatographie), die sich sowohl zum Abdampfen des Lösungsmittels als auch zur Aufbewahrung der Proben verwenden lassen, und dampft im Vakuum ein. Vor dem Einspritzen in den Gaschromatographen erfolgt die Zugabe von 20 µl Dichlormethan, um die Substanz zu lösen.

Die Bestimmung der freien Pantothenensäure im Urin erfordert einen Reinigungsschritt. Eine von *Panalaks & Campbell* (25) beschriebene Ionenaustauscherbehandlung wurde zu diesem Zweck abgeändert. Eine mit Glaswatte abgedichtete Chromatographiesäule (Glas, Reservoirsäulen, 10 mm Innendurchmesser, 250 mm Länge) füllt man bis zu 50 mm Höhe mit Anionenaustauscher (Amberlite, CG-400 I, Pract.), der zuvor mit dest. Wasser gewaschen wurde und deckt die Schicht mit einem Glaswattepfropfen ab. Diese Säule wird mit 30 ml NaCl-Lösung (NaCl, DAB 7, 100 g/l) und 100 ml dest. Wasser gewaschen. Vor dem Gebrauch wird die Säule mit 30 ml Borsäurelösung (Borsäure, DAB 7, 50 g/l) gewaschen, um die Cl-Ionen gegen Borationen auszutauschen. Diese können von den Pantothenationen verdrängt werden. Die Probe wird mit dest. Wasser auf 5 ml aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Es folgen Waschungen mit 2 × 10 ml Borsäurelösung, (50 g/l) 10 ml 0,01 mol/l Natronlauge und 10 ml dest. Wasser. Die Elution der Pantothenensäure geschieht durch Zugabe von 7 ml gesättigter NaCl-Lösung. Die gereinigte Probe wird nach dem Ansäuern wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Die Säulen werden durch Waschen mit 30 ml Natriumchloridlösung, (100 g/l) 30 ml 0,2 mol/l tri-Natriumphosphat-12-hydrat (reinst) und 100 ml dest. Wasser regeneriert.

Zuverlässigkeitskriterien

Linearität der Messung

Der lineare Verlauf der Eichkurve wurde überprüft, indem zu konstanten Mengen an Standard (2,4 µg Myristinsäuremethylester) variable Mengen von Panto-lacton zugewogen wurden. Für einen Bereich von 0,1–1000,0 µg Lacton (entsprechend 0,168–1685,0 µg Pantothenensäure) konnte die Linearität der Messung nachgewiesen werden. Zur Auswertung kamen 35 Ergebnisse. Der hierbei ermittelte Eichfaktor ergab für einen dynamischen Bereich von $1:10^4$ einen Mittelwert von 2,017 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,081$; der relative Fehler betrug also 4 %.

Im folgenden Diagramm (Abb. 1) sind die Flächenverhältnisse von Lacton und Standard gegen die eingesetzten Mengen an Lacton aufgetragen. Es wird deutlich, daß die Eichkurve über den Bereich von $1:10^4$ linear verläuft. Bei der Berechnung der linearen Regression ergab sich für einen Bereich von 0,1–10,0 µg Lacton ein Regressionskoeffizient von 4,980, eine Regressionskonstante von –0,033 und ein Korrelationskoeffizient von 0,997.

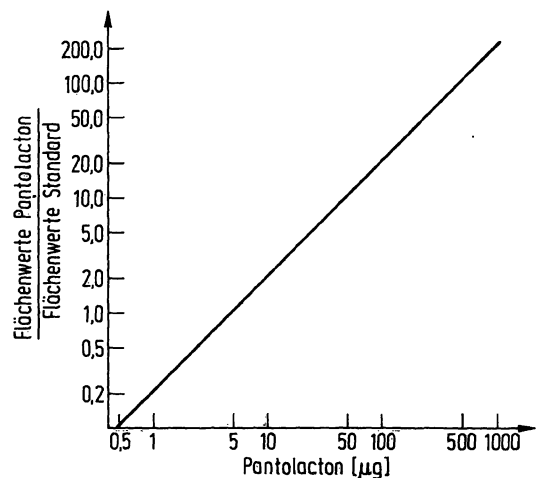


Abb. 1. Überprüfung der Linearität der Messung

Präzision der Messung

Um eine Aussage über die Fehlerbreite der Messung zu erhalten, wurde ein und dieselbe Eichlösung über einen Zeitraum von 4 Monaten in regelmäßigen Abständen gemessen. Es lagen 34 Meßergebnisse zur Auswertung vor. Die statistische Berechnung ergab eine Standardabweichung von ± 5 %. Dabei muß bemerkt werden, daß während dieses Zeitraumes beide Säulen ausgewechselt wurden.

Richtigkeit der Analyse

Die Richtigkeit der Analyse wurde durch die Aufarbeitung von Calciumpantothenatlösungen überprüft, die analog der Arbeitsvorschrift für Urinproben erfolgte.

Calciumpantothenat wurde zu diesem Zweck in dest. Wasser gelöst. Probenmengen von 0,2–100,0 µg Calciumpantothenat je Analyse, entsprechend 0,001–1,0 g/l, wurden eingesetzt. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einer entsprechenden Meßreihe.

Weitere Anhaltspunkte für die Richtigkeit der hier beschriebenen Methode ergaben sich durch die Aufarbeitung von Urinproben, denen Calciumpantothenat in Mengen von 0,2–100,0 µg je Probe zugesetzt wurde. Bei der quantitativen Auswertung mußte die Berechnung über den Faktor für das Lacton erfolgen. Von dem berechneten Gesamtgehalt wurde die Lactonmenge im Urin abgezogen. Unter Berücksichtigung eines Umrechnungsfaktors von Lacton auf Calciumpantothenat kann die wiedergefundene Menge an Calciumpantothenat ermittelt werden.

Tabelle 2 zeigt die Wiederfindungsrate des zugesetzten Calciumpantothenats. Die Wiederfindung liegt also bei $100 \pm 5\%$.

Tab. 1. Überprüfung der Richtigkeit der Analyse
Messung von Reinsubstanzen

Calciumpantothenat eingewogen (µg)	Calciumpantothenat gefunden (µg)	Wiederfindungsrate (%)
0,30	0,29	97
0,40	0,38	95
0,50	0,55	110
0,60	0,56	94
0,60	0,63	105
1,00	0,91	91
1,00	1,04	104
1,00	0,86	87
1,50	1,41	94
2,00	2,00	100
2,00	1,98	99
3,00	3,00	100
5,00	5,22	104
10,00	10,12	101
20,00	20,01	100
30,00	31,23	104
50,00	51,44	103
50,00	52,02	104
100,00	107,62	108
100,00	98,33	98
		$\bar{x} = 99,9$
		$s = \pm 5,59$

Tab. 2. Überprüfung der Richtigkeit der Analyse
Zusatz von Calciumpantothenat zu Urinproben

Pantothersäure des Urins (µg)	n	Ca-Pantothenat zugesetzt (µg)	Ca-Pantothenat gefunden (µg)	Wiederfindung (%)
3,21	3	1,0	1,01	100
3,21	1	2,0	2,00	100
3,21	3	5,0	4,97	99
1,05	3	1,0	0,98	98
				$\bar{x} = 99,6$
				$s = \pm 4,6$

Spezifität

Eine Gegenüberstellung der Chromatogramme von Mangelratten und mit Pantothersäure normalversorgten Tieren demonstriert die Spezifität der Analyse. Der Urin von Ratten, die über einen Zeitraum von einem Jahr pantothersäurefrei ernährt wurden, enthält keine Pantothersäure. Störsubstanzen, die mit dem Lacton überlagerte Peaks zeigen, müßten ein Signal geben, das auch in diesem Chromatogramm an der Stelle des Lactons sichtbar ist. Abbildung 2 zeigt das Chromato-

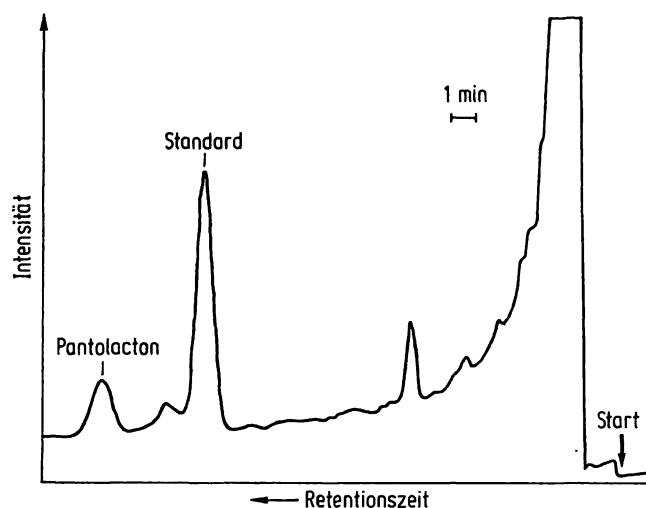


Abb. 2. Überprüfung der Spezifität
Chromatogramm des Urins einer mit Pantothersäure versorgten Ratte.

Gaschromatographische Bedingungen:
Glassäule 3 m x 3 mm, 4 % LAC-2 R 446 auf Gaschrom Q, 120–150 mesh, Säulentemperatur 140°C, Detektortemperatur 250°C, Trägergasdurchfluß (N₂) 13 ml/min, Wasserstoffdurchfluß 35 ml/min, Preßluftdurchfluß 500 ml/min, Schreibervorschub 10 mm/min.

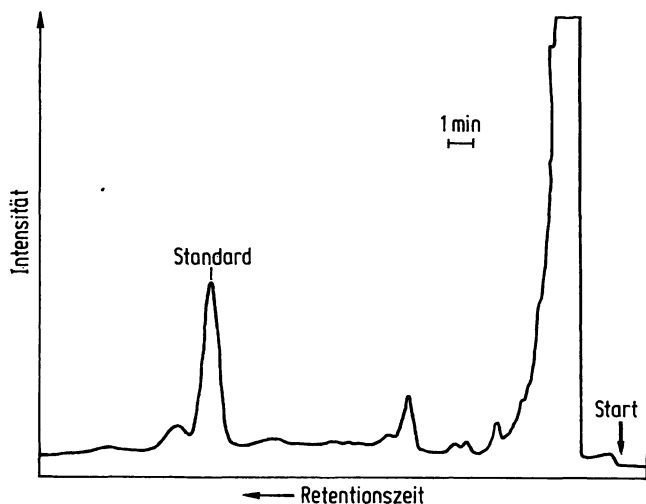


Abb. 3. Überprüfung der Spezifität
Chromatogramm des Urins einer pantothersäurefrei ernährten Ratte

Gaschromatographische Bedingungen:
Glassäule 3 m x 3 mm, 4 % LAC-2 R 446 auf Gaschrom Q, 120–150 mesh, Säulentemperatur 140°C, Detektortemperatur 250°C, Trägergasdurchfluß (N₂) 13 ml/min, Wasserstoffdurchfluß 35 ml/min, Preßluftdurchfluß 500 ml/min, Schreibervorschub 10 mm/min.

gramm einer Urinprobe, die von einem mit Pantothersäure versorgten Tier genommen wurde, Abbildung 3 gibt das Chromatogramm der Urinprobe eines Mangeltieres wieder. Es ist zu ersehen, daß im Chromatogramm des Urins eines Mangeltieres (Abb. 3) die Stelle, an der der Lactonpeak zu erwarten ist, frei bleibt. Hiermit wird als erwiesen angesehen, daß Überlagerungen mit Störpeaks in Urinanalysen nicht vorliegen und der zur Auswertung für den Pantothersäuregehalt der Proben herangezogene Peak spezifisch die Pantothersäure bzw. das Pantolacton ist.

Reproduzierbarkeit

Standardproben von Humanurin wurden portionsweise tiefgefroren und in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 4 Monaten analysiert. Die Probenmenge betrug 1 ml je Analyse. Tabelle 3 enthält die Ergebnisse dieser Messungen.

Um die Reproduzierbarkeit der Pantothersäureanalyse weiterhin zu überprüfen, wurden von einem Sammelurin unterschiedliche Probenvolumina untersucht. Tabelle 4 gibt die Ergebnisse der entsprechenden Messungen wieder.

Diskussion

Mit der hier beschriebenen gaschromatographischen Methode zur Bestimmung von Pantothersäure ist es gelungen, die Ausscheidung dieses Vitamins im Urin genau zu bestimmen. Die Vor- und Nachteile dieser Methode müssen im Vergleich zu den in der Einführung kurz aufgeführten bekannten Bestimmungsmethoden gesehen werden. Entscheidende Gesichtspunkte eines derartigen Vergleichs sind:

die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
die Nachweisgrenze

die Spezifität und Anfälligkeit gegen Störfaktoren
der Zeitaufwand zur Durchführung der Analyse.

Die bisher beschriebenen chemischen Methoden beruhen auf der Reaktion der funktionellen Gruppe eines Spaltproduktes der Pantothersäure, z. B. der Aminogruppe des β -Alanins, mit einem Reagenz, beispielsweise Ninhydrin, unter Bildung eines Farbstoffes, dessen Kon-

Tab. 4. Überprüfung der Reproduzierbarkeit
Pantothersäuregehalt von Urinproben bei unterschiedlichen Ausgangsmengen

Urin Nr.	μ l Urin	Pantothersäure μ g/Probe	μ g/ml Urin
III ^x	200	0,153	0,767
	300	0,225	0,750
	400	0,341	0,852
	500	0,386	0,776
	600	0,445	0,772
	700	0,562	0,800
	800	0,625	0,781
	900	0,698	0,775
	1000	0,788	0,788
			$\bar{x} = 0,798$
			$s = \pm 0,032$
			$= \pm 4,0 \%$
IV	200	0,564	2,82
	500	1,335	2,67
			$\bar{x} = 2,745$
			$S = \mp 0,130$
			$= \mp 4,7 \%$
			$n = 8$

^x) Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert einer Doppelanalyse

zentration photometrisch ausgewertet wird. Ihre Anwendbarkeit in biologischem Material (z. B. Urin) erscheint in Frage gestellt, da diese Reaktionen gruppenspezifisch sind und Verbindungen mit gleichen funktionellen Gruppen dieselben Reaktionen geben können. Für diese chemischen Methoden sind Mengen an Pantothersäure von 0,2–3,0 mg erforderlich, also etwa die tausendfache Menge wie bei der hier erarbeiteten gaschromatographischen Methode. Sowohl die Spezifität als auch die Empfindlichkeit der chemischen Bestimmung in der bisher beschriebenen Form genügen also nicht den Anforderungen, die an eine Methode zur Pantothersäurebestimmung im Urin gestellt werden müssen.

Die Gaschromatographie bietet die Möglichkeit, bei geringen Substanzmengen eine reproduzierbare Messung durchzuführen. Voraussetzungen bisher bekannter gaschromatographischer Methoden zur Erfassung der Pantothersäure ist die Derivatisierung im wasserfreien Medium. Diese Bedingung erschwert ihren Einsatz für die serienmäßige Bestimmung der Pantothersäure. Die Anwendung der oben genannten gaschromatographischen Methoden in biologischem Material wurde nicht beschrieben. Bisher war es nur unter Anwendung mikrobiologischer Methoden möglich, den Pantothersäuregehalt im Urin zu bestimmen. Bei der Untersuchung von biologischem Material können dessen Inhaltsstoffe die Wachstumsbedingungen für die Testorganismen so beeinflussen, daß sich eine falsche Aussage über den Pantothersäuregehalt der Probe ergibt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist aus diesem Grund bei

Tab. 3. Überprüfung der Reproduzierbarkeit
Pantothersäuregehalt von Standardurinproben
Probenmenge 1 ml

Standard- urin	n	$\bar{x}(\mu$ g)	$(\pm \mu$ g)	s
				$(\pm \%)$
I	20	1,008	0,063	6,2
II	8	0,707	0,052	7,3
III	10	2,429	0,156	6,4
IV	10	1,735	0,139	8,0

unterschiedlicher Zusammensetzung der Probe nicht sichergestellt. Die üblicherweise im Urin vorliegenden Mengen an Pantothersäure ermöglichen die Anwendung des hier beschriebenen gaschromatographischen Verfahrens.

Die Bestimmung der Pantothersäure mit der hier beschriebenen Methode hat sich in Tierversuchen bewährt. Bei etwa 500 Analysen war es möglich, die technische Ausführung so zu gestalten, daß die Aufarbeitung von 20 Proben je Tag und Person vorgenommen werden kann.

Literaturverzeichnis

1. Lang, K. (1970) Biochemie der Ernährung, 2. Aufl., Steinkopf Verlag Darmstadt, 542.
2. Hock, A. (1966) Vergleichende Ernährungslehre des Menschen und seiner Haustiere, Fischer Verlag, Stuttgart, 774.
3. Szorady, J. (1967) Die klinische Bedeutung der Pantothersäure unter besonderer Berücksichtigung der Kinderheilkunde, Studia Medica, Szeged, 21–23.
4. Wagner, M., Schubert, U. & Hötzel, D. (1972) Med. u. Ern. 13, 25–29.
5. Hegsted, M. D. & Lipmann, F. (1948) J. Biol. Chem., 174, 89–92.
6. Skeggs, H. R. & Wright, D. D. (1944) J. Biol. Chem., 156, 21–26.
7. Pennington, D., Snell, E. E. & Williams, R. J. (1940) J. Biol. Chem., 135, 213–225.
8. Hatano, M. J. (1962), J. Vitaminol., 8, 134–142.
9. Schweigert, B. S. & Guthneck, B. (1953) J. Nutr., 51, 283–291.
10. Ives, M., Zeppelin, M., Ames, St. A., Strong, M. & Elevhjem, C. A. (1945) J. Amer. Diet. Assoc., 21, 357–359.
11. Markkanen, T. (1973) Internat. J. Vit. Nutr. Res., 43, 302–317.
12. Schmall, M. & Wollish, E. G. (1957) Anal. Chem., 29, 1509–1513.
13. Panier, R. G. & Close, J. A. (1964) J. Pharm. Sci., 53, 108–110.
14. Hubbard, W. D. & Sheppard, A. J. (1969) J. Assoc. Off. Analyt. Chem., 52, 448–450.
15. Zappala, A. F. & Simpson, C. A. (1961) J. Pharm. Sci., 50, 845–847.
16. Scalkowsky, C. R., Marder, W. J. & Frediani, H. A. (1951) Cereal Chem., 28, 218–225.
17. Haefelfinger, P. & Bader-Beerly, U. (1972) Fresenius Z. Anal. Chem., 262, 189–191.
18. Dowd, N. E. (1967) Technicon Symposia, Vol. 1, 263–266, Mediad. Inc. 202, Mamaroneck Av., White Plains, N.Y.
19. Albright, B. E. (1968) Automation in Analytical Chemistry, New York City and Brighton, Technicon Symposia, Vol. 1, 443–446.
20. Tarli, P., Benocci, S. & Neri, P. (1970) Il Farmaco, Ed. Pr., 25, 504–511.
21. Prosser, A. R. & Sheppard, A. J. (1969) J. Pharm. Sci., 58, 718–721.
22. Williams, R. J., Mitchell, H. K., Weinstock, H. H. & Snell, E. E. (1940) J. Amer. Chem. Soc., 62, 1784–1785.
23. Stiller, E. T., Keresztesy, J. C. & Finkelstein, J. (1940) J. Amer. Chem. Soc., 62, 1779–1784.
24. Kaiser, R. (1969) Chromatographie in der Gasphase, IV Quantitative Auswertung, Teil I und II, Hochschultaschenbücher, Bibliographisches Institut, Mannheim–Zürich.
25. Panalaks, T. & Campbell, J. A. (1962) Anal. Chem., 34, 64–66.

Dipl.-Troph. Erika Schulze zur Wiesch
Institut für Ernährungswissenschaft der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
5300 Bonn
Endenicher Allee 11–13